

学位論文の要旨

In vitro mouse spermatogenesis with an organ
culture method in chemically defined medium

(化学組成の明らかな培養液を用いた体外精巣器官培養法)

Hiroyuki Sanjo

三條 博之

Urology

Yokohama City University Graduates School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 泌尿器科学

(Doctoral Supervisor: Masahiro Yao, Professor)

(指導教員：矢尾 正祐 教授)

学位論文の要旨

In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium (化学組成の明らかな培養液を用いた体外精巣器官培養法)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192884>

1. 序論

現代社会において不妊症の診断基準を満たすカップルは6組に1組存在する。男性側に不妊の原因がある場合は全体の 50%とされ、この問題の解決のために基礎的な研究が期待される分野である。

2011 年にアガロースゲル上で新生仔マウス精巣を培養する精巣器官培養法に牛血清由来アルブミン製剤である AlbuMAX を用いることで精原幹細胞から妊孕能のある精子産生が可能であるという報告がなされた(Sato et al. 2011)。しかし、AlbuMAX 中の何がそのような効果を生むのかは不明のままであった。

それらの因子の同定のため、市販のエタノール処理法により抽出されたウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA)に各種因子を添加して培養する系を提案し、検証を行った。遊離脂肪酸、レチノイン酸、各ホルモンを添加した培養液で 5.5 日齢のマウスまでは培養が可能であることを確認した。

2. 実験材料と方法

合成培地(CDM)を作成するために、市販の BSA でどのような抽出法由来の BSA が適しているかを検証するため抽出法の異なる 3 種類の BSA を比較検証した。

合成培地には単独で精子形成進行能を認めないエタノール処理法により抽出されたアルブミンを選定した。BSA は DDW で溶解し、溶解液に検証したい物質を添加した。遊離脂肪酸やコレステロールやリン脂質などの脂質群については溶解液に添加した後 3 時間程スターラーで攪拌しアルブミンへの結合を促進した。

至適培養液はアルブミン溶液に遊離脂肪酸や、レチノイン酸、各種ホルモンを添加し、基礎培地として α MEM を添加して完成した。これら培養液を $10 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3$ 大に形成したアガロースゲル周囲を満たすように添加し、12 ウェルプレート内で培養する。マウス精巣組織はアガロースゲル上に 1 mm^2 大の大きさに細切して静置した。

実験は *Acrosin-GFP* トランスジェニックマウス(4.5~6.5 日齢)を用いた。これらのマウスは減数分裂中期より細胞質にアクロシン蛋白を発現し、減数分裂の進行とともにアクロソームが凝集して GFP の局在と形態が変化する特徴がある。即ち、蛍光顕微鏡で観察することで、培養組織内の精子形成の過程を切片の作成をすることなく把握することが可能であ

る。精子形成の効率と、*Acrosin-GFP*の発現している面積は正の相関が見られるため、それらの面積を Grading し GFP grade として扱い、定量化した。

組織は適宜 HE 染色及び免疫組織化学的染色により評価し、半数体の進行は倒立顕微鏡による目視及び PAS 染色による詳細な検討により円形精子細胞、伸張精子細胞、精子の検討を行った。

3. 結果

3種類の抽出法で得られた BSA はクロマトグラフィー処理の BSA (Sigma 社, A2058) のみに精子形成促進能を認めた。AlbuMAX も同様に特殊なクロマトグラフィー処理によって抽出された BSA であり、クロマトグラフィー処理の BSA に精子形成を促進する脂質群が結合していることがわかった。

それら精子形成促進因子を持たない BSA としてエタノール処理法により抽出した BSA (Sigma 社, A9418) を脂質やレチノイン酸などの添加因子を培養液中に溶解するための担体として利用した。レチノイン酸は精子形成過程において必須のビタミンであり、レチノイン酸単独で精子形成を進行するか確認した。

結果としてレチノイン酸と BSA のみの培養液では精子形成の進行は認めなかった。次に BSA とレチノイン酸に AlbuMAX に豊富に含まれている遊離脂肪酸やコレステロール、リン脂質、スフィンゴミエリンなどの脂質群を添加して培養を行ったところ、精子形成がやや効率よく進行する像がみられた。

さらに BSA にレチノイン酸と脂質群、精子形成に必要とされるホルモン 4 種を添加して培養したところ精子形成の効率がさらに改善し、5.5 日齢のマウスにおいて円形精子細胞まで分化することが確認された。

4. 考察

合成培地により 5.5 日齢マウス精巣から円形精子まで精子形成を進行させることが可能となった。レチノイン酸単独で減数分裂が完遂しないこと、脂溶性物質が減数分裂を促進し得ること、ホルモンの添加により減数分裂の完遂が飛躍的に効率化されることが示された。しかし幼弱なマウス精巣では同様の所見を得ることができないため、AlbuMAX に含有されていて合成培地に添加すべき因子は多数残存している可能性を示唆しているとかがえらる。今回提示した系は精子形成を促進する因子の同定については極めて有効な手段であり、in vitro で他臓器からの影響のない精巣環境を再現することが可能である。

引用文献

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., et al., 2011. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471(7339), pp.504–507.

論文目録

I 主論文

1. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium
Hiroyuki SANJO, Mitsuru Komeya, Takuya Sato, Takeru Abe, Kumiko Katagiri, Hiroyuki Yamanaka, Yoko Ino, Noriaki Arakawa, Hisashi Hirano, Tatsuma Yao, Yuta Asayama, Akio Matsuhisa, Masahiro Yao, Takehiko Ogawa:
PLoS One, 13(2): e0192884. 2018

III 参考論文

1. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device
Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Hiroyuki SANJO, Yao M, Kamimura S, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Fujii T, Ogawa T:
Sci Rep, 6, 21472, 2016
2. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro
Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Hiroyuki SANJO, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T:
Sci Rep, 7(1), 15459, 2017
3. A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility
Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Hiroyuki SANJO, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T:
Biochem Biophys Res Commun, 500(4), 885-891, 2018
4. Reactive oxygen species measured in the unprocessed semen samples of 715 infertile patients
Yumura Y, Takeshima T, Kawahara T, Hiroyuki SANJO, Kuroda SN, Asai T, Mori K, Kondou T, Uemura H, Iwasaki A.
Reprod Med Biol, 16(4), 354-363. 2017.